

ラット中脳動脈閉塞・再灌流モデルにおける抗 HMGB1 単クローン抗体の治療効果

劉 克約^{a*}, 森 秀治^a, 高橋 英夫^a, 友野 靖子^b, 和 気 秀 徳^a, 菅 家 徹^a,
佐 藤 康 晴^c, 平 賀 憲 人^d, 足 立 尚 登^d, 吉 野 正^c, 西 堀 正 洋^a

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a薬理学, ^c病理学（腫瘍病理）, ^b重井医学研究所, ^d愛媛大学大学院 麻酔蘇生学

キーワード：抗体医薬，炎症，HMGB1，脳梗塞，血液脳関門

Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats

Keyue Liu^{a*}, Shuji Mori^a, Hideo K. Takahashi^a, Yasuko Tomono^b, Hidenori Wake^a, Toru Kanke^a, Yasuharu Sato^c,
Norihiro Hiraga^d, Naoto Adachi^d, Tadashi Yoshino^c, Masahiro Nishibori^a

Departments of ^aPharmacology, ^cPathology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ^bShigei Medical Institute,
^dDepartment of Anesthesiology and Resuscitology, Ehime University Graduate School of Medicine

はじめに

脳血管障害は日本人の死因の第3位をしめ、その内約60%は脳梗塞によるものである。現在、脳梗塞の急性期治療薬として、組換え体 t-PA やラジカルスカベンジャーのエダラボンが臨床応用されているが、有効治療時間帯の制限や虚血再灌流障害あるいは副作用等の問題があり、真に有効な治療法がない。

High mobility group box1 (HMGB1) は、最近新たな起炎性の因子として注目されはじめたサイトカインである。1999年 Wang らが、マウスのエンドトキシンショックモデルにおいて、HMGB1 が遅発相における致死性因子として働くことを報告した。その後

HMGB1 が種々の臨床疾患に関与することが明らかにされてきた¹⁻³⁾。我々は、脳梗塞の形成過程において炎症性の応答が増悪的な役割を果たすとの仮説を持っている。ラット中大脳動脈2時間閉塞・再灌流モデル(MCAO)を用いて、再灌流直後と6時間後に抗HMGB1 単クローン抗体を200 μ g、2回静脈内投与することによって、脳梗塞急性期における治療効果及びメカニズムを検討した。

HMGB1 の構造と機能

HMG family は30年以上前に同定された核内に存在する非ヒストンタンパクで⁴⁾、DNA 結合能を持つ A box, B box, さらに酸性アミノ酸が連続する acidic tail から構成されている。HMG には HMGA, HMGB, HMGN の3種類があり、HMGB には HMGB1, 2, 3 が存在し、その相同性は80%である⁵⁾。通常核内に局在する HMGB1 は、刺激により2つの様式で細胞外へ放出されると考えられている。1つは、壊死細胞の核

平成20年9月受理

*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-7138 FAX：086-235-7138

E-mail：liukeyue@md.okayama-u.ac.jp

プロフィール



劉 克約

昭和51年中国中山医科大学医学部卒業，同年中国北京医学科学院がんセンター 麻酔科に入局。以来，ずっと臨床麻酔の仕事をしてきた。平成5年愛媛大学医学部 麻酔・蘇生学に客員研究員として新井達潤教授，足立尚登先生ご指導の下，薬物と臓器蘇生について研究を始め，平成10年医学博士の学位を取得。平成18年より岡山大学医学部薬理学の助手となる。本研究は，西堀正洋教授，高橋英夫准教授ご指導の下，脳梗塞急性期の抗体治療薬及びメカニズムの解析を主として研究を行ったものです。研究結果を FASEB J. に発表した。現在，疾患動物実験モデルにおける治療薬の開発及びメカニズムの解析を研究続けている。

内から受動的に放出され、もう1つは、LPS, TNF- α , IL-1 β などの刺激によって濃度依存的に活性化されたマクロファージや単球から細胞外へ分泌されるものである。細胞外に放出された HMGB1 は、RAGE あるいは TLR-2/4⁶⁾等の複数の受容体に作用して、炎症性サイトカインとして働く⁷⁾。我々は、複数の特異的抗 HMGB1 ラット単クローン抗体を製作し、それぞれ抗体の特性を確認した。その中で、抗 HMGB1 抗体(#10-22)は HMGB1 配列のN末端側からアミノ酸残基207残基目から215残基目(DEEEDDDDE)をエピトープとすることを決定した。HMGB1 刺激により、ヒトの単球では ICAM-1の発現を上昇することが観察される。抗 HMGB1 抗体(#10-22)を添加すると、濃度依存性に ICAM-1発見の上昇が抑制された。このことから#10-22抗体は、HMGB1 に対する中和活性を有すると考えられた。

脳梗塞に対する抗 HMGB1 単クローン抗体の効果

ウィスター系ラットを用いて、吸入麻酔下にシリコンコーティングした4.0ナイロン糸の塞栓子を内頸動脈に挿入し、中大脳動脈起始部を2時間閉塞した後、2時間後に再灌流した。再灌流直後、6時間後に抗 HMGB1 抗体または対照抗体を投与し(200 μ g/kg/iv)治療効果を比較検討した。

1. 脳梗塞巣体積の抑制及び運動麻痺の改善

虚血再還流後24時間あるいは48時間に脳を取り出す。視交叉と乳頭体尾端との間で脳を2mmの厚さにスライスし、TTC 染色をした。抗 HMGB1 単クローン抗体の投与によって、梗塞巣の体積は虚血24時間後90%、48時間後75%に抑制された。運動機能はロタロッドテストにより評価を行った。回転のスピードにより運動機能を3段階に分けた。手術の3日前、動物に学習をさせて、再還流後6時間、12時間、24時間各時間でテストを行い、同時に点数をつけて片麻痺症状を評価した。抗 HMGB1 抗体投与により、運動機能及び片麻痺の改善が認められた(図1)。一方、HMGB1 精製蛋白を脳室内投与すると、運動麻痺と梗塞巣の体積は対照群より増悪が見られた。これらの結果から虚血神経障害の病態と HMGB1 に密接な関連があると考えられる。

2. HE 染色及び免疫染色による組織学的評価

虚血再還流12時間後の HE 染色により、コントロール群では虚血側の大脳皮質、線条体部位で多数の神経

細胞死が見られた。抗 HMGB1 抗体投与群では、細胞の壊死が明らかに抑制された(図2)。HMGB1 免疫染色で、虚血後脳内 HMGB1 の分布を調べた。非虚血側と比較し、虚血側では、細胞核の陽性反応が減弱していた。本来細胞核に存在する HMGB1 は、虚血の刺激で細胞外へ放出したことが示唆された。抗 HMGB1 抗体投与すると、虚血側陽性反応の低下が抑制された(図3)。虚血によって神経細胞死の進行は、抗 HMGB1 抗体の中和作用で食い止められたと推定された。

3. 血管透過性, MMP 活性, ミクログリア活性化の抑制

虚血後の循環障害に関して、最も微小な循環障害が注目されている。組織破壊に重要な役割を果たしているマトリックス分解酵素 MMP の活性化によって血液脳関門の破綻が促進され、脳浮腫の形成と関連があることが報告された^{8,9)}。虚血再還流3時間後、血管透過性をエバンスブルー漏出を指標として抗 HMGB1 単クローン抗体の効果を評価した。Gelatin zymography 法により、虚血側と非虚血側のマトリックス分解酵素を検出した。抗 HMGB1 抗体投与により、血管透過性の亢進及び MMP-9の活性を著しく抑制した(図4, 5)。虚血性神経細胞死の主因として、興奮性神経伝達物質グルタミン酸の神経毒作用が提唱されている。HMGB1 は虚血障害によるグリア細胞から放出されたグルタミン酸の取り込み輸送を抑制して、細胞外のグルタミン酸濃度を増加させるという報告がある¹⁰⁾。Griffonia simplicifolia (IB4)-lectin- HRP での免疫組織化学分析の結果は、抗 HMGB1 単クローン抗体投与によって、ミクログリアの活性化が抑制されることを示した(図6)。

4. サイトカイン誘導の抑制

虚血再還流6時間後、大脳皮質と線条体について非虚血側、ペナンプラ、梗塞巣から一定面積を打ち抜きによりサンプリングした。総 RNA を抽出し、Real-time PCR で、7種類の炎症因子の発現量を β -actin を対照として定量化した。抗 HMGB1 単クローン抗体投与群は、炎症性サイトカイン TNF- α 及び iNOS の誘導を抑制したことを確認できた(図7)。

考 察

HMGB1 は多数の炎症性病態に関与することが報告されている。マウスの腹膜炎モデルは、抗 HMGB1 抗体投与によって死亡率が低下した¹¹⁾。急性肺炎、肝炎、

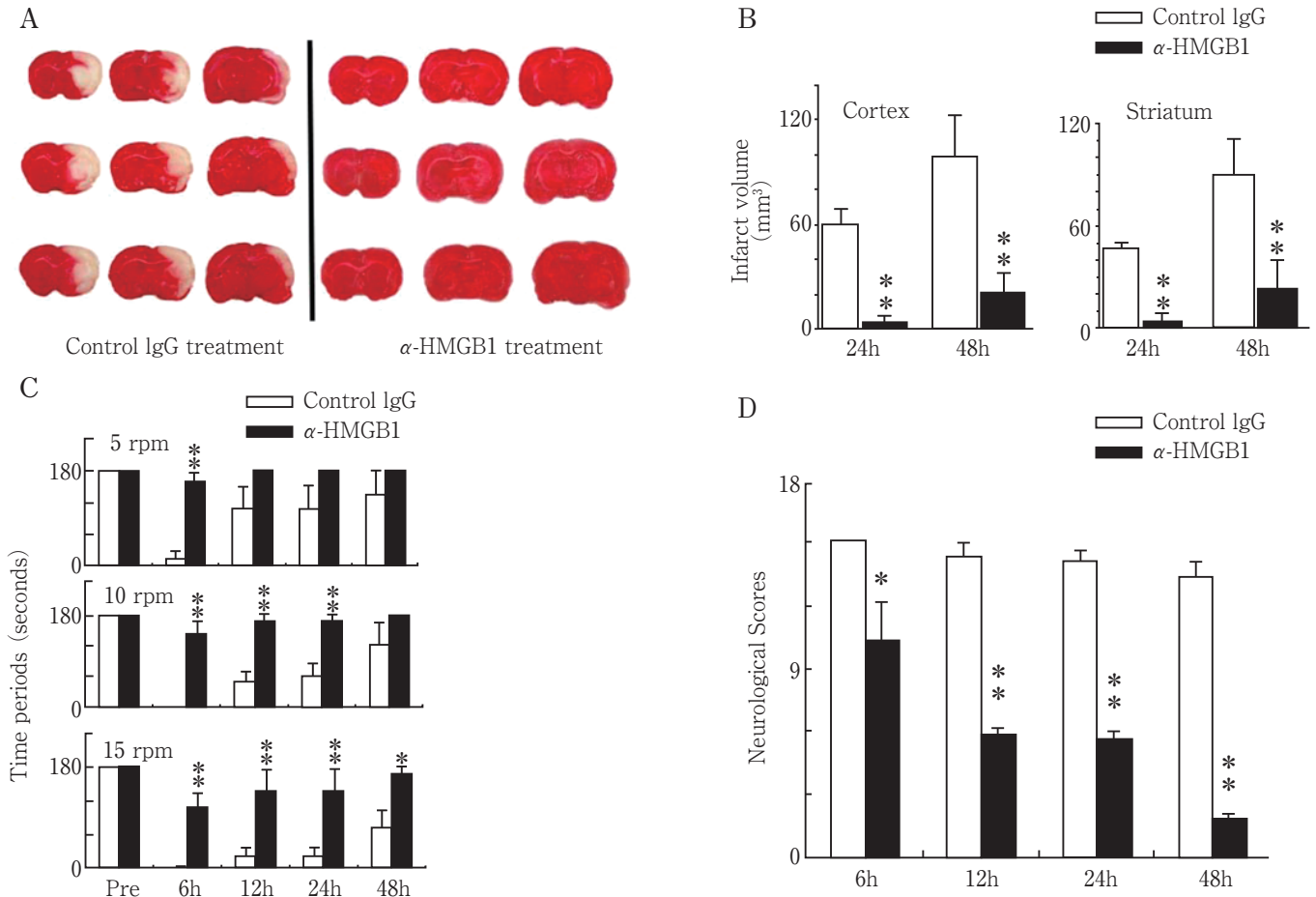


図1 ラット中大脳動脈2時間閉塞・再灌流による神経障害に対する抗 HMGB1 抗体の効果

A：コントロール群（左）と抗 HMGB1 抗体投与群（右）各3個体の脳組織写真で、再還流24時間後 TTC 染色した結果。

B：NIHimager を用いて、再還流24、48時間後大脳皮質及び線条体の梗塞巣体積を測定した結果。（N=5，*P<0.05，**P<0.01）

C：Rota-rod test による、運動機能の評価。再還流6、12、24、48時間後、回転数を三段階に分け、コントロール群と比較した。

D：Bederson et の方法により、再灌流6、12、24、48時間後、麻痺症状をスコア化し、治療効果を評価した。（N=4，*P<0.05，**P<0.01）

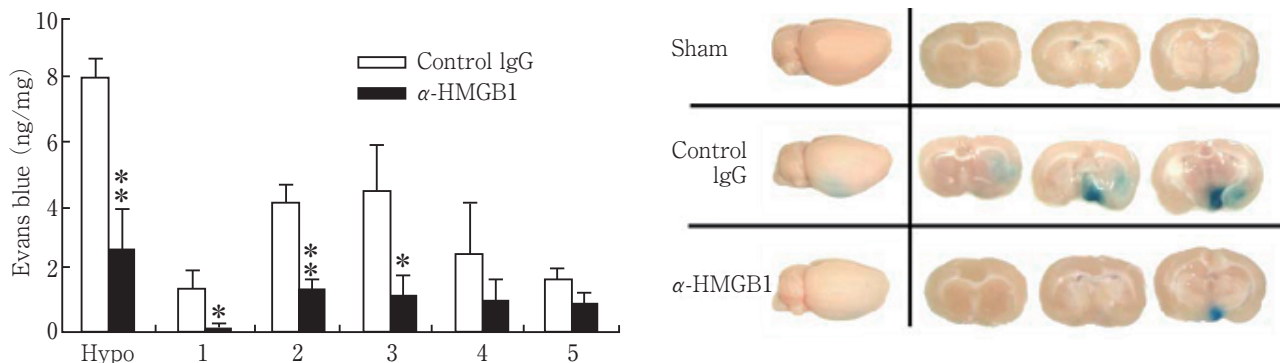


図4 Evans blue の漏出

虚血再還流直後に Evans blue を静脈投与して（2% 2ml/kg.iv），3時間後脳を取り出して、吻側から尾側5箇所のスライスをサンプリングし、漏出した色素を蛍光光度計で定量分析した（N=4，*P<0.05，**P<0.01）。

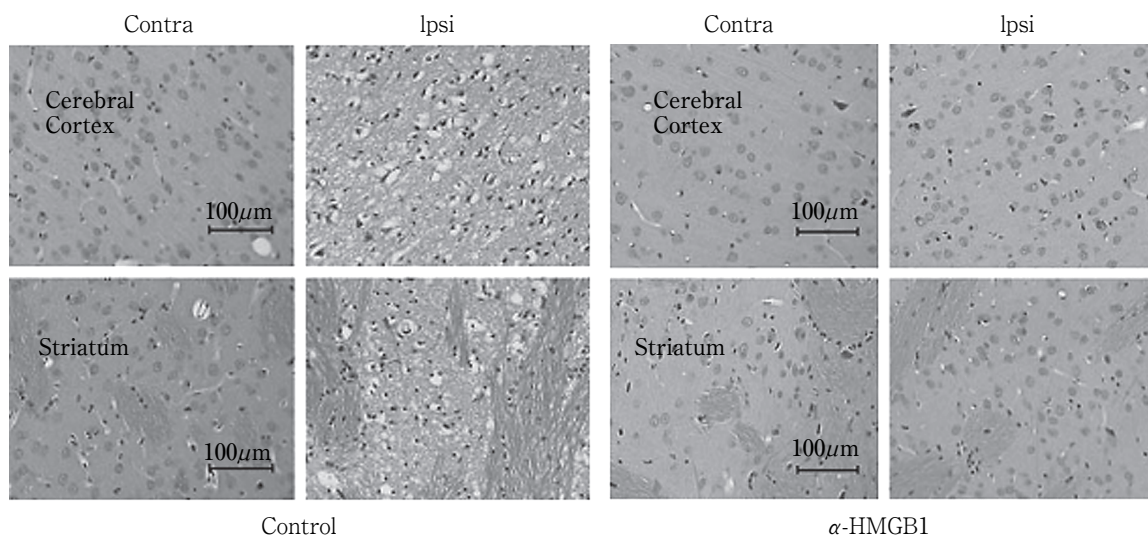


図2 脳の HE 染色
再還流12時間後、ホルマリン灌流固定した脳組織切片の HE 染色写真

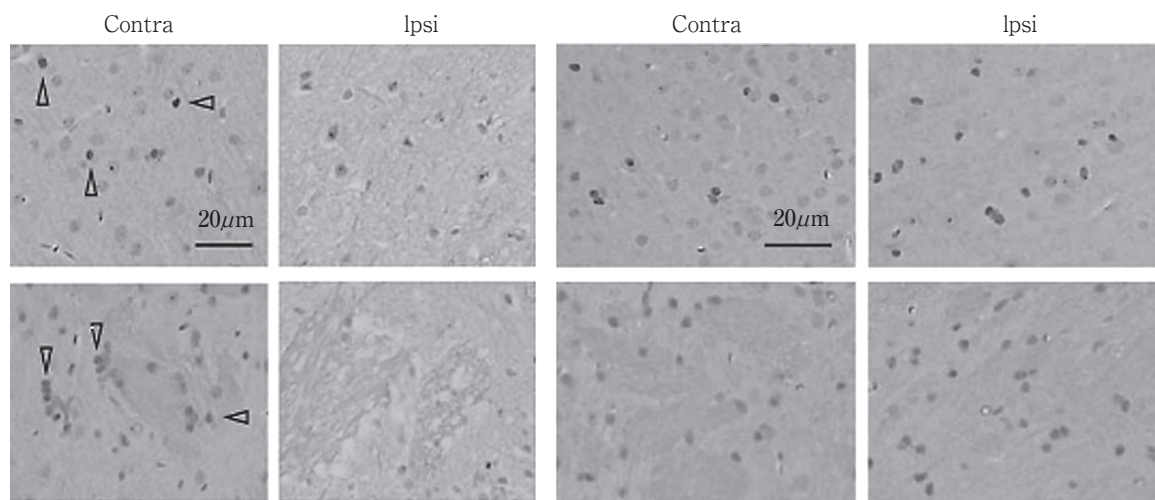


図3 Anti-HMGB1 mAb を用いた脳組織の HMGB1 陽性細胞の検出. 矢印を示したのは細胞核の陽性反応

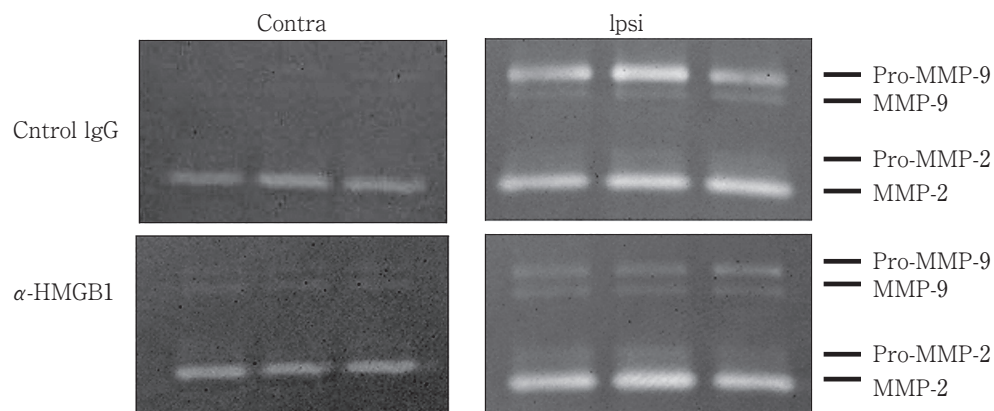


図5 マトリックス分解酵素 MMP の活性
再還流 6 時間後、虚血側、非虚血側に分けてサンプリングし、gelatin zymography で、分析した。

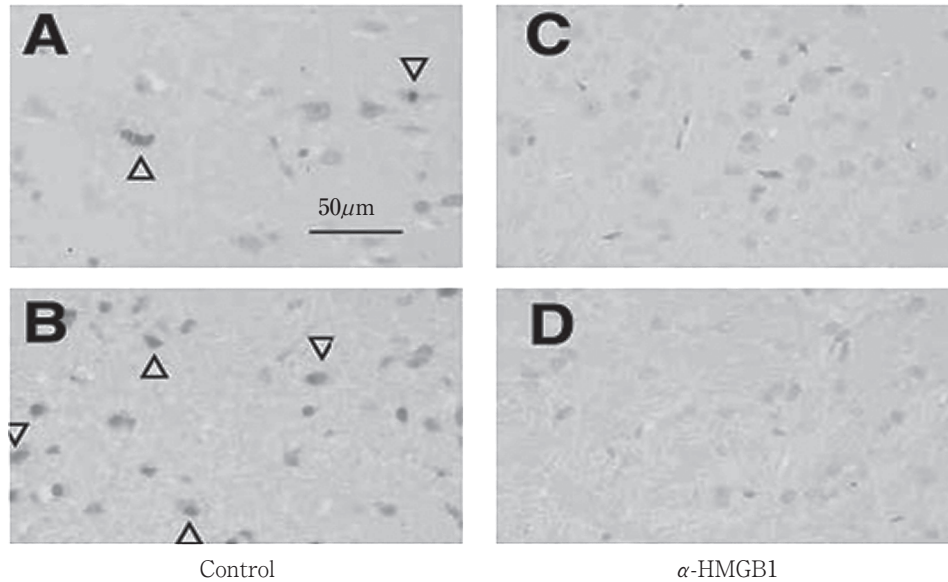


図6 ミクログリアの活性化

(IB4)-lectin- HRP を用いて，再還流12時間後，虚血側，非虚血側の活性化ミクログリアを同定した．矢印で示したのは，陽性のミクログリア細胞（200倍）

	Cerebral cortex				Striatum			
	Control IgG		α-HMGB1		Control IgG		α-HMGB1	
	Cntra	Ipsi	Cntra	Ipsi	Cntra	Ipsi	Cntra	Ipsi
HIF-1α								
COX-2								
iNOS								
TNF-α								
IL-18								
MMP-2								
MMP-9								
β-actin								
	Control IgG treatment				α-HMGB1 treatment			

図7 脳組織におけるサイトカインの発現誘導

虚血再還流 6 時間後，大脳皮質部と線条体部について非虚血側，ペナンプラ，梗塞巣から一定面積を打ち抜きによりサンプリングした．総 RNA を抽出し，Real-time PCR で，7 種類の炎症因子の発現量を β -actin の対照として定量化した．(N=4, *P < 0.05, **P < 0.01)．

リウマチ様関節炎等の炎症性病態 HMGB1 との関連が示唆されている¹²⁻¹⁴⁾．

マクロファージ，単球細胞由来 HMGB1 の刺激により，IL-1α/β，TNF-α，IL-6，IL-8，および MIP-1α/β

が産生され，また iNOS の誘導を引き起こす．そして，単球細胞をパラクライン的に活性させる¹⁵⁻¹⁷⁾．また，ミクログリアにおける iNOS と TNF-α の誘導によって虚血脳障害は促進させる^{18,19)}．

iNOS, TNF- α , および MMP-9 の誘導によって、炎症応答反応及び血液脳関門の破綻が促進され、脳梗塞を進行させる^{20,21)}。これらの要因のいずれかを抑えられると虚血性障害を抑制できると推定された。抗 HMGB1 抗体は3つの要因を抑える能力を持つ、良い治療薬になると思われる。

終 わ り

脳虚血後の神経細胞障害から細胞死に至る過程には、細胞内カルシウム濃度の上昇、興奮性神経伝達物質の放出、アシドーシス、フリーラジカル等、様々な因子が報告されている^{22,23)}。我々の結果により、虚血性脳細胞機能障害の進行に対して、HMGB1 が深く関与していることを確認できた。壊死した細胞核から放出された HMGB1 は、単球、好中球を活性化して、炎症を引き起こす。炎症反応によって、血管内皮細胞の障害から、血液—脳関門の透過性の増加、脳浮腫の発生と促進にいたる一連の生体反応において、HMGB1 は、重大な働きをする。抗 HMGB1 抗体の中和作用で、ミクログリア、MMPs, TNF- α , iNOS 等炎症因子の活性化を抑制することにより、早期の虚血障害の進行が抑えられたことを示唆した。本研究は、脳梗塞病態形成において極めて重要な働きをする標的分子を見出したことを意味しており、抗 HMGB1 抗体自身が非常に優れた抗体医薬となり得る可能性を強く示唆している。

文 献

- 1) Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, et al : HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* (1999) 285, 248-251.
- 2) Lotze MT, Tracey KJ : High-mobility group box1 protein (HMGB1) : nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev* (2005) 5, 331-342.
- 3) Ulloa L, Tracey KJ : The "cytokine profile" : a code for sepsis. *Trends Mol Med* (2005) 11, 56-63.
- 4) Goodwin GH, Sanders C, Johns EW : A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* (1973) 38, 14-19.
- 5) Bustin M : Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* (1999) 19, 5237-5246.
- 6) Harris HE, Andersson U : The nuclear protein HMGB1 as proinflammatory mediator. *Eur J Immunol* (2004) 34, 1503-1512.
- 7) Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME : Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* (2002) 418, 191-195.
- 8) Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH : Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury. Mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* (2002) 33, 2711-2717.
- 9) Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH : Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of bloodbrain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* (2001) 21, 7724-7732.
- 10) Pedrazzi M, Raiteri L, Bonanno G, Patrone M, Ledda S, Passalacqua M, Milanese M, Melloni E, Raiteri M, Pontremoli S, Sparatore B : Stimulation of excitatory amino acid release from adult mouse brain glia subcellular particles by high mobility group box 1 protein. *J Neurochem* (2006) 99, 827-838.
- 11) Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, Wang H, DiRaimo R, Czura CJ, Wang H, et al : Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101, 296-301.
- 12) Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, Amaya F, Kitamura Y, Tanaka M, Kobayashi A, Maruyama I, Yamada S, Hasegawa N, Soejima J, Koh H, et al : Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* (2004) 170, 1310-1316.
- 13) Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR : The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* (2005) 201, 1135-1143.
- 14) Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger AC, Palmblad K, Yang H, Tracey KJ, Andersson U, Harris HE : Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum* (2003) 48, 2052-2058.
- 15) Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ : High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* (2000) 192, 565-570.
- 16) Ren D, Sun R, Wang, S : Role of inducible nitric oxide synthase expressed by alveolar macrophages in high mobility group box 1-induced acute lung injury. *Inflamm Res* (2006) 55, 207-215.
- 17) Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepäntalo M, Carpen O,

- Parkkinen J, Rauvala H : Regulation of monocyte migration by amphotericin (HMGB1). *Blood* (2004) 104, 1174-1182.
- 18) Han HS, Qiao Y, Karabiyikoglu M, Giffard RG, Yenari MA : Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *J Neurosci* (2002) 22, 3921-3928.
 - 19) Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B : Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* (2000) 20, 53-65.
 - 20) Iadecola C, Zhang F, Xu X : Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* (1995) 268, R286-292.
 - 21) Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ : Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* (1997) 28, 1233-1244.
 - 22) Rothman SM, Olney JW : Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* (1986) 19, 105-111.
 - 23) Siesjö BK, Bengtsson F : Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression : a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* (1989) 9, 127-140.